

C3 nephritic factor (C3NeF) の培養ラットメサングウム細胞増殖に及ぼす影響

著者	成田 満義
号	2683
発行年	1994
URL	http://hdl.handle.net/10097/21115

氏 名（本籍） 成 田 満 義

学 位 の 種 類 博 士（医 学）

学 位 記 番 号 医 第 2683 号

学位授与年月日 平成 6 年 9 月 7 日

学位授与の条件 学位規則第 4 条第 2 項該当

最 終 学 歴 昭和 60 年 3 月 31 日
山形大学医学部医学科卒業

学 位 論 文 題 目 C3 nephritic factor (C3NeF) の培養ラットメ
サンギウム細胞増殖に及ぼす影響

(主 査)

論文審査委員 教授 阿 部 圭 志 教授 佐々木 毅

教授 折 笠 精 一

論文内容要旨

メサンギウム細胞 (MC) の増殖を主体とする IgA 腎症や膜性増殖性糸球体腎炎 (MPGN) では, MC の増殖とともに C3 や membrane attack complex (MAC) などの補体成分の沈着が観察され, 補体系が腎炎の発症, 進展に強く関与していると考えられている。また, 培養 MC を用いた研究では, MAC が MC の増殖因子産生を促し MC の増殖をもたらすことが報告されている。著明な MC の増殖と持続的低補体血症を特徴とする MPGN, 特にその II 型では補体第二経路の C3 convertase である C3bBb を安定化し, 補体系を持続的に活性化する C3 nephritic factor (C3NeF) が高頻度に検出される。この点に着目し C3NeF が MAC を介して培養ラットメサンギウム細胞 (GMC) の増殖に与える影響について検討した。

【方 法】

Sprague-Dawley ラットの腎皮質から sieving 法によって糸球体を単離, 培養後, 回収した細胞を継代培養して得られた均一な細胞を GMC とした。GMC の同定は形態学, 免疫化学, 生理学的特徴によって行った。C3NeF は C3bBb の neoantigen に対する IgG 自己抗体である。正常血清に被験血清を加え産生される C3bBb 量を測定する清野らの ELISA 法により, C3NeF 陽性と判明した MPGN II 型患者の血清から, イオン交換クロマトグラフィー法およびゲルろ過法によって monomeric IgG を分離, 精製し C3NeF として使用した。コントロールとしての正常 IgG (NIgG) は正常人血清から同様の方法で精製し用いた。継代培養したメサンギウム細胞を静止期の状態とし, 正常ヒト血清 (NHS) 単独または C9 欠損血清 (C9D) 単独, C3NeF 単独, NIgG 単独, さらにヒト血清とともに C3NeF または NIgG をそれぞれ加えて 24 時間培養した。各条件下で培養後, ^3H -thymidine を添加し, さらに 6 時間培養後 GMC 内への thymidine 取り込みを測定し GMC 増殖の指標とした。またメサンギウム細胞にヒト血清あるいはヒト血清とともに C3NeF または NIgG を加え, 抗マウス C5b-9 抗体を用いた間接酵素抗体法により細胞上の MAC 形成を観察した。

【結 果】

NHS 単独では, その 5% 濃度まで濃度依存性に thymidine 取り込みは著明に増加したが, C9D 単独では濃度による促進効果は軽度であった。NHS で刺激した GMC 上には MAC の顆粒状沈着が確認され, 高濃度で沈着は増強した。このことから, NHS による取り込みの増加には血清中に含まれるサイトカイン以外に MAC 形成も関与していることが推測された。補体源とし

てのヒト血清を加えずに C3NeF, NIgG を 25, 50 $\mu\text{g/ml}$ で加えた場合, 取り込みは増加しなかった。この結果から, 用いた濃度の範囲では C3NeF や NIgG は GMC 上の Fc レセプターへ結合して直接的に GMC に増殖刺激効果を与えないことが示された。2.5%濃度の NHS 存在下では C3NeF (50 $\mu\text{g/ml}$) は取り込みを著明に増加させた。NIgG でも増加がみられたが C3NeF に比べ軽度であった。非働化 NHS, C9D 存在下では, C3NeF, NIgG とも取り込みは増加させなかった。2.5% NHS 存在下での C3NeF による GMC 増殖促進効果は, C3NeF 濃度依存性であり, 18 時間, 24 時間で有意の増加がみられた。さらに NHS とともに C3NeF で刺激した場合には NHS 単独に比べ, GMC 上の MAC 沈着の増強が確認された。

これらの結果から, C3NeF は補体全成分の存在下で GMC の増殖を著明に促進し, この効果は MAC 形成を介した反応であることが示唆された。

【考 察】

佐藤らは, GMC に単離精製した C5b6, C7, C8, C9 で作成した MAC を加えることによって細胞増殖への影響を検討している。その結果, 単離 MAC の単回刺激のみでは GMC の有意な増殖はみられなかったが, PDGF や高濃度の非働化 FCS の存在下では MAC により著明な細胞増殖が認められた。これらから, PDGF や血清中のサイトカインと MAC の相互作用が細胞増殖をもたらすと推測している。今回の実験では C3NeF によって GMC 細胞上に持続的な, sublytic な MAC 形成が行われ, GMC 自体の autogrowth factor となるプロスタグランジンやサイトカインが産生されて GMC の増殖が促進されるものと考えられる。この場合, NHS 中に含まれるサイトカインと MAC の相互作用による増殖効果も考えられる。MAC の直接的な関与をさらに確認するためには, 同様の系で抗 C9 抗体を用いた実験などが必要と思われる。しかし今回の実験で, MAC が形成されない系として NHS に代えて非働化 NHS あるいは C9D を用いた場合には, C3NeF による GMC 増殖の促進は認められなかったことから, GMC 増殖に MAC が関与していることが示唆された。C3NeF の GMC への効果をヒト腎炎と同等に論ずることはできないが, ヒト腎炎でのメサンギウム領域への MAC 沈着は, MAC が MC 膜上の補体制御蛋白に抗して細胞増殖に関わっている可能性を示している。今回の実験結果から補体系の強力な活性化因子である C3NeF が MPGN における著明な MC 増殖に強く関与していることが推測された。

審 査 結 果 の 要 旨

メサンギウム増殖性糸球体腎炎や膜性増殖性糸球体腎炎 (MPGN) はメサンギウム細胞 (MC) の増殖及びメサンギウム基質の増加を特徴とするが、その機序は未だに解明されていない。これらの腎炎では、MC 増殖に加えて腎糸球体への補体 C3 や膜侵襲複合体 (MAC : C5b-9) の沈着が種々の程度にみられ、補体系が MC 増殖及び腎炎発症に強く関与していることが示唆されている。

そこで著者は、補体系、特に MAC 及び MPGN II 型で高頻度に検出される強力な補体活性化因子 C3 nephritic factor (C3NeF) を培養ラット MC (RMC) に作用させ、補体系が MC 増殖に及ぼす影響を *in vitro* で検討した。

培養メサンギウム細胞を用い、腎炎の発症、進展機序を解明しようとする試みは新しい方向性を示した研究であるが、この方法による補体の関与の検討は現在までほとんど行われていない。MAC は本来細胞溶解性に作用するが、sublytical dose では細胞刺激効果を有する。本研究では MAC を、精製した C5~C9 より再構築して (C5b-9) 及び正常ヒト血清 (NHS) に C3NeF を加えて (NeF-MAC) を作成し、RMC に作用させた。RMC は C5b-9 の C9 に、又 NeF-MAC の C3NeF により容量依存性に増殖した。過剰の MAC 形成条件下では増殖は観察されなかった。*in vitro* での観察をヒト腎炎と同等に論ずることはできないが、腎炎でメサンギウム領域に MAC 沈着が観察されることよりも、MAC が MC 膜上の補体制御蛋白に抗して MC を増殖させることが示唆された。さらに、今回の結果から強力な補体活性化因子である C3NeF が MPGN における著明な MC 増殖に関与していることも示された。これまで MAC や C3NeF の直接的な MC 増殖効果の報告はなく、従って本論文は独創的な研究であり、十分学位論文に値するものと考えられる。